

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HERewith

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE rpsL GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	101 07 230.9	FEBRUARY 16, 2001
GERMANY	101 62 386.0	DECEMBER 19, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ Number 101 07 230.9 is submitted herewith
- ☒ Number 101 62 386.0 will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SHIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

James J. Kelly, Ph.D.
Registration No. 41,504



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

jc997 U.S. PTO
10/075460
02/15/02

#3
J.G.
3/27/02

36379



jc997 U.S. PRO
10/075460



02/15/02

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 07 230.9

Anmeldetag: 16. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Neue für das rpsL-Gen kodierende Nukleotid-
sequenzen

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 14. Januar 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Nietiedt

Neue für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das rpsL-Gen
5 verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

10. Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rpsL-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des ribosomalen Proteins S12 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptides nicht verändern

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind schließlich Polynukleotide ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1 und 499

b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der

Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 500 und 883

- c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 884 und 1775.

Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das rpsL-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das ribosomale Protein S12 kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu

isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des rpsL-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu
5 detektieren und zu bestimmen

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das ribosomale Protein S12
10 kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende
15 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150,
20 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es
25 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu
30 wenigstens besonders 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%,

97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragmentes.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
5 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des ribosomalen Proteins S12 und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt
10 zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

15 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-
20 Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das rpsL-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

25 Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene
30 erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann

5 sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- 10 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
15 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
20 *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
25 *Brevibacterium flavum* FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
30 *Corynebacterium glutamicum* DG52-5
Corynebacterium glutamicum DSM5714 und
Corynebacterium glutamicum DSM12866.

Das neue, für das ribosomale Protein S12 kodierende rpsL-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

Zur Isolierung des rpsL-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses
5 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
10 Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
15 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
20 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

25 Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und
30 rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in
35 gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren

subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

- 5 Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical
10 Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

- Die neue für das Gen rpsL kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen
15 Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des rpsL-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins
20 abspalten können.

- Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID
25 No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner
30 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Derartige Mutationen werden unter anderem auch als neutrale Substitutionen bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht
35 wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können.

Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

10 In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich
15 aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter
20 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride
25 gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der
30 Salzkonzentration beeinflußt bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).
- 25 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).
- 30 Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Verstärkung des rpsL-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die

Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des

5 Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.

10 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin

15 eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei

20 Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei

25 Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift

30 JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße rpsL-Gen

35 beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden

überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))

beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Es wurde weiterhin gefunden, dass Aminosäureaustausche in dem Abschnitt zwischen Position 38 bis 48 der Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins S12 dargestellt in SEQ ID No. 2 die Lysinproduktion coryneformer Bakterien verbessern.

Vorzugsweise wird L-Lysin an der Position 43 gegen jede andere proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Lysin ausgetauscht, wobei der Austausch gegen L-Histidin oder L-Arginin bevorzugt wird. Ganz besonders bevorzugt wird der Austausch gegen L-Arginin.

In SEQ ID No. 3 ist die Basensequenz des in Stamm DM1545 enthaltenen Allels rpsL-1545 dargestellt. Das rpsL-1545 Allel kodiert für ein Protein, dessen Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 4 dargestellt ist. Das Protein enthält an Position 43 L-Arginin. Die DNA Sequenz des rpsL-1545 Allels (SEQ ID No. 3) enthält anstelle der im rpsL Wildtypgen (SEQ ID No. 1) an Position 627 enthaltenen Base Adenin die Base Guanin.

Für die Mutagenese können klassische Mutageneseverfahren unter Verwendung mutagener Stoffe wie beispielsweise N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder ultraviolettes Licht verwendet werden. Weiterhin können für die Mutagenese in-vitro Methoden wie beispielsweise eine Behandlung mit Hydroxylamin (Miller, J. H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, 1992) oder mutagene Oligonukleotide (T. A. Brown: Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993) oder die Polymerasekettenreaktion (PCR), wie sie im
5 Handbuch von Newton und Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994) beschrieben ist, verwendet werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem rpsL-Gen eines oder mehrere
10 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

15 So kann für die Herstellung von L-Lysin zusätzlich zur Verstärkung des rpsL-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- 20 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 25 • das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-
30 198 31 609),

- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mgo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 5 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Kalinowski et al., Molecular Microbiologie 5(5), 1197-204 (1991)),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- 10 • das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 (DE: 19959328.0, DSM 13115), und
- das für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase B kodierende rpoB-Gen dargestellt in SEQ ID No. 5 und 6

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem
- 15 Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel
- 20 verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren
- 25 vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des rpsL-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- 30 • das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

5 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Verstärkung des *rpsL*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: 10 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren 15 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 20 (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den 25 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

30 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren

wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das
15 Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium
20 können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen
25 wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur
30 Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur
35 eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise

bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Eine Reinkultur des Corynebacterium glutamicum Stammes DM1545 wurde am 16. Januar 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) als DSM 13992 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
5 wird wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)
beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI
(Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell
gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer
10 Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wird mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
20 dephosphoryliert.

Anschließend wird die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wird mit der
25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wird anschließend mit Hilfe
des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla,
30 USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract,
Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) werden die Zellen
in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der

- Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank werden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
- 5 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert werden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des rpsL-Gens

- 10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wird mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-
- 15 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die Isolierung der Cosmidfragmente im
- 20 Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

- Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande,
- 25 Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wird mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den
- 30 Sequenziervektor pZero-1 wird wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wird. Dieses Ligationsgemisch wird

anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 5 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgt mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgt nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings 10 of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wird der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

15 Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgt in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, 20 Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten werden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate werden zu einem 25 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wird mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergibt ein 30 offenes Leseraster von 383 Basenpaaren, welches als rpsL-Gen bezeichnet wird. Das rpsL-Gen kodiert für ein Protein von 127 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das rpoL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000779 BT

<140>

10 <141>

<160> 6

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1775

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (500)..(880)

25 <223> rpsL-Wildtypgen

<400> 1

cagctctaca agagtgtcta agtggcgggc attccatgct ttggaggagc gatcttcaaa 60
 ttcctccaaa gtgagttgac ctcggaagac agctgcagaa agttcatcca cgacttggtt 120
 30 tcggttaagg tcagtggcga gcttctttgc tggttcggtt ccttgaggaa cagtcattggg 180
 aaccattcta acaagggatt tgggtgtttc tgcggctagc tgataatgtg aacggctgag 240
 35 tcccactctt gtagttggga attgacggca cctcgactc aagcgcggtta tcgcccctgg 300
 ttttcgggga cgcggtggcg catgtttgca tttgatgagg ttgtccgtga catgtttggt 360
 cgggcccaaa aaagagcccc cttttttgcg tgtctggaca ctttttcaaa tccttcgcca 420
 40 tcgacaagct cagccttcgt gttcgtcccc cgggcgtcac gtcagcagtt aaagaacaac 480
 tccgaaataa ggatggttc atg cca act att cag cag ctg gtc cgt aag ggc 532
 Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly
 45 1 5 10
 cgc cac gat aag tcc gcc aag gtg gct acc gcg gca ctg aag ggt tcc 580
 Arg His Asp Lys Ser Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser
 15 20 25
 50 cct cag cgt cgt ggc gta tgc acc cgt gtg tac acc acc acc cct aag 628
 Pro Gln Arg Arg Gly Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Thr Pro Lys
 30 35 40
 55 aag cct aac tct gct ctt cgt aag gtc gct cgt gtg cgc ctt acc tcc 676
 Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser
 45 50 55

ggc atc gag gtt tcc gct tac atc cct ggt gag ggc cac aac ctg cag 724
 Gly Ile Glu Val Ser Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln
 60 65 70 75

5 gag cac tcc atg gtg ctc gtt cgc ggt ggt cgt gtt aag gac ctc cca 772
 Glu His Ser Met Val Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro
 80 85 90

10 ggt gtc cgt tac aag atc gtc cgt ggc gca ctg gat acc cag ggt gtt 820
 Gly Val Arg Tyr Lys Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val
 95 100 105

15 aag gac cgc aag cag gct cgt tcc ccg cta cgg cgc gaa gag ggg ata 868
 Lys Asp Arg Lys Gln Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile
 110 115 120

att aaa aat gcg taaatcagca gtcctaagc gtccagtagt tcaggaccct 920
 Ile Lys Asn Ala
 125

20 gtatacaagt ccgagctcgt taccagctc gtaaacaaga tctcatcgg tggcaagaag 980
 tccaccgcag agcgcacgt ctacggtgca ctcgagatct gccgtgagaa gaccggcacc 1040

25 gatccagtag gaaecctcga gaaggctctc ggcaacgtgc gtccagacct cgaagtctgt 1100
 tcccgccgtg ttggtggcgc tacctaccag gtgccagtgg atgttcgccc agagcgcgca 1160

30 aacaccctcg cactgcgttg gttggttaacc ttcaccctc agcgtcgtga gaacaccatg 1220
 atcgagcgtc ttgcaaacga acttctggat gcagccaacg gccttggcgc ttccgtgaag 1280
 cgtcgcgaag acaccacaa gatggcagag gccaaccgcg ctttcgtca ctaccgctgg 1340

35 tagtactgcc aagacatgaa agcccaatca cttttaagat caacgcctgc cggcgccctt 1400
 cacatttgaa taagctggca gcctgcgttt cttcaaggcg actgggcttt tagtctcatt 1460

40 aatgcagttc accgctgtaa gatagctaaa tagaaacact gtttcggcag tgtgttacta 1520
 aaaaatccat gtcacttgcc tcgagcgtgc tgcttgaatc gcaagttagt ggcaaaatgt 1580
 aacaagagaa ttatccgtag gtgacaaact ttttaatact tgggtatctg tcatggatac 1640

45 cccggttaata aataagtga ttaccgtaac caacaagttg gggtaccact gtggcacaag 1700
 aagtgcctaa ggatctaaac aaggtccgca acatcgcat catggcgcac atcgatgctg 1760

50 gtaagaccac gacca 1775

<210> 2
 <211> 127
 <212> PRT
 55 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
 Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly Arg His Asp Lys Ser
 1 5 10 15

Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser Pro Gln Arg Arg Gly
20 25 30

5 Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Thr Pro Lys Lys Pro Asn Ser Ala
35 40 45

Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser Gly Ile Glu Val Ser
50 55 60

10 Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Met Val
65 70 75 80

15 Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr Lys
85 90 95

Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val Lys Asp Arg Lys Gln
100 105 110

20 Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile Ile Lys Asn Ala
115 120 125

25 <210> 3
<211> 1775
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>
<221> CDS
<222> (500)..(880)
<223> rpsL-Gen Allel 1545

35 <400> 3
cagctctaca agagtgtcta agtggcgggc attccatgct ttggaggagc gatcttcaaa 60
ttcctccaaa gtgagttgac ctcgggaaac agctgcagaa agttcatcca cgacttggtt 120

40 tcggttaagg tcagtggcga gcttctttgc tggttcgttt ccttgaggaa cagtcattggg 180
aaccattcta acaagggtt ttggtgtttc tgcggctagc tgataatgtg aacggctgag 240

45 tccactctt gtagttggga attgacggca cctgcactc aagcgcggtg tgcgccctgg 300
ttttccggga cgcggtggcg catgtttgca tttgatgagg ttgtccgtga catgtttggt 360

cgggccccaa aaagagcccc cttttttgcg tgtctggaca ctttttcaaa tccttcgcca 420

50 tcgacaagct cagccttcgt gttcgtcccc cgggcggtcac gtcagcagtt aaagaacaac 480
tccgaaataa ggatgggtc atg cca act att cag cag ctg gtc cgt aag ggc 532
Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly
1 5 10

55 cgc cac gat aag tcc gcc aag gtg gct acc gcg gca ctg aag ggt tcc 580
Arg His Asp Lys Ser Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser
15 20 25

cct cag cgt cgt ggc gta tgc acc cgt gtg tac acc acc acc cct agg 628
 Pro Gln Arg Arg Gly Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Thr Pro Arg
 30 35 40

5 aag cct aac tct gct ctt cgt aag gtc gct cgt gtg cgc ctt acc tcc 676
 Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser
 45 50 55

10 ggc atc gag gtt tcc gct tac atc cct ggt gag ggc cac aac ctg cag 724
 Gly Ile Glu Val Ser Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln
 60 65 70 75

15 gag cac tcc atg gtg ctc gtt cgc ggt ggt cgt gtt aag gac ctc cca 772
 Glu His Ser Met Val Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro
 80 85 90

20 ggt gtc cgt tac aag atc gtc cgt ggc gca ctg gat acc cag ggt gtt 820
 Gly Val Arg Tyr Lys Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val
 95 100 105

aag gac cgc aag cag gct cgt tcc ccg cta cgg cgc gaa gag ggg ata 868
 Lys Asp Arg Lys Gln Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile
 110 115 120

25 att aaa aat gcg taaatcagca gctcctaagc gtccagtagt tcaggaccct 920
 Ile Lys Asn Ala
 125

30 gtatacaagt ccgagctcgt taccagctc gtaaacaaga tcctcatcgg tggcaagaag 980
 tccaccgcag agcgcacgtc ctacggtgca ctcgagatct gccgtgagaa gaccggcacc 1040
 gatccagtag gaaccctcga gaaggctctc ggcaacgtgc gtccagacct cgaagtctgt 1100

35 tcccgccgtg ttggtggcgc tacctaccag gtgccagtgg atgttcgccc agagcgcgca 1160
 aacaccctcg cactgcgttg gttggtaacc ttcaccgcgc agcgtcgtga gaacaccatg 1220
 atcgagcgtc ttgcaaacga acttctggat gcagccaacg gccttggcgc ttccgtgaag 1280

40 cgtcgcggaag acaccacaa gatggcagag gccaaccgcg ccttcgctca ctaccgctgg 1340
 tagtactgcc aagacatgaa agcccaatca cctttaagat caacgcctgc cggcgccctt 1400

45 cacatttgaa taagctggca gcctgcgttt cttcaaggcg actgggcttt tagtctcatt 1460
 aatgcagttc accgctgtaa gatagctaaa tagaaacact gtttcggcag tgtgttacta 1520

50 aaaaatccat gtcacttgcc tcgagcgtgc tgcttgaatc gcaagttagt ggcaaaatgt 1580
 aacaagagaa ttatccgtag gtgacaaact ttttaatact tgggtatctg tcatggatac 1640
 cccggttaata aataagttaa ttaccgtaac caacaagttg gggtaaccact gtggcacaag 1700

55 aagtgccttaa ggatctaaac aaggtccgca acatcggcac catggcgcac atcgatgctg 1760
 gtaagaccac gacca 1775

<210> 4
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 5
 <400> 4
 Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly Arg His Asp Lys Ser
 1 5 10 15
 10 Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser Pro Gln Arg Arg Gly
 20 25 30
 Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Thr Pro Arg Lys Pro Asn Ser Ala
 35 40 45
 15 Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser Gly Ile Glu Val Ser
 50 55 60
 20 Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Met Val
 65 70 75 80
 Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr Lys
 85 90 95
 25 Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val Lys Asp Arg Lys Gln
 100 105 110
 Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Gly Ile Ile Lys Asn Ala
 115 120 125
 30
 <210> 5
 <211> 5099
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 35
 <220>
 <221> CDS
 <222> (702)..(4196)
 <223> rpoB-Gen
 40
 <400> 5
 acaatgtgac tcgtgatttt tgggtggatc agcgtaccgg ttggttgctc gatctagctg 60
 45
 aaaatattga tgatttttac ggcgaccgca gcggccagaa gtacgaacag aaattgcttt 120
 tcgacgcctc cctcgacgat gcagctgtct ctaagctggt tgcacaggcc gaaagcatcc 180
 50
 ctgatggaga tgtgagcaaa atcgcaaata ccgtaggtat tgtgatcggt gcggtattgg 240
 ctctcgtggg cctggccggg tgttttgggg cgtttgggaa gaaacgtcga gaagcttaac 300
 ctgctgttca aatagatttt ccctgtttcg aattgcggaa accccgggtt tgtttgctag 360
 55
 ggtgcctcgt agaaggggtc aagaagattt ctgggaaacg cgcccgtgcg gttggttgct 420
 aatagcacgc ggagcaccag atgaaaaatc tcccctttac ttctgcgcgc gattggtata 480

	ctctgagtcg	ttgcgttgga	attcgtgact	cttttttcggt	cctgtagcgc	caagaccttg	540
	atcaaggtgg	tttaaaaaaa	ccgatttgac	aagggtcattc	agtgctatct	ggagtcgttc	600
5	aggggggatcg	ggttcctcag	cagaccaatt	gctcaaaaat	accagcggtg	ttgatctgca	660
	cttaatggcc	ttgaccagcc	aggtgcaatt	acccgcgtga	g	gtg ctg gaa gga ccc	716
						Val Leu Glu Gly Pro	
					1		5
10	atc ttg gca gtc tcc cgc cag acc aag tca gtc gtc gat att ccc ggt	764					
	Ile Leu Ala Val Ser Arg Gln Thr Lys Ser Val Val Asp Ile Pro Gly						
		10		15		20	
15	gca ccg cag cgt tat tct ttc gcg aag gtg tcc gca ccc att gag gtg	812					
	Ala Pro Gln Arg Tyr Ser Phe Ala Lys Val Ser Ala Pro Ile Glu Val						
		25		30		35	
20	ccc ggg cta cta gat ctt caa ctg gat tct tac tcc tgg ctg att ggt	860					
	Pro Gly Leu Leu Asp Leu Gln Leu Asp Ser Tyr Ser Trp Leu Ile Gly						
		40		45		50	
25	acg cct gag tgg cgt gct cgt cag aag gaa gaa ttc ggc gag gga gcc	908					
	Thr Pro Glu Trp Arg Ala Arg Gln Lys Glu Glu Phe Gly Glu Gly Ala						
		55		60		65	
	cgc gta acc agc ggc ctt gag aac att ctc gag gag ctc tcc cca atc	956					
	Arg Val Thr Ser Gly Leu Glu Asn Ile Leu Glu Glu Leu Ser Pro Ile						
		70		75		80	85
30	cag gat tac tct gga aac atg tcc ctg agc ctt tcg gag cca cgc ttc	1004					
	Gln Asp Tyr Ser Gly Asn Met Ser Leu Ser Leu Ser Glu Pro Arg Phe						
		90		95		100	
35	gaa gac gtc aag aac acc att gac gag gcg aaa gaa aag gac atc aac	1052					
	Glu Asp Val Lys Asn Thr Ile Asp Glu Ala Lys Glu Lys Asp Ile Asn						
		105		110		115	
40	tac gcg gcg cca ctg tat gtg acc gcg gag ttc gtc aac aac acc acc	1100					
	Tyr Ala Ala Pro Leu Tyr Val Thr Ala Glu Phe Val Asn Asn Thr Thr						
		120		125		130	
45	ggt gaa atc aag tct cag act gtc ttc atc ggc gat ttc cca atg atg	1148					
	Gly Glu Ile Lys Ser Gln Thr Val Phe Ile Gly Asp Phe Pro Met Met						
		135		140		145	
	acg gac aag gga acg ttc atc atc aac gga acc gaa cgc gtt gtg gtc	1196					
	Thr Asp Lys Gly Thr Phe Ile Ile Asn Gly Thr Glu Arg Val Val Val						
		150		155		160	165
50	agc cag ctc gtc cgc tcc ccg ggc gtg tac ttt gac cag acc atc gat	1244					
	Ser Gln Leu Val Arg Ser Pro Gly Val Tyr Phe Asp Gln Thr Ile Asp						
		170		175		180	
55	aag tca act gag cgt cca ctg cac gcc gtg aag gtt att cct tcc cgt	1292					
	Lys Ser Thr Glu Arg Pro Leu His Ala Val Lys Val Ile Pro Ser Arg						
		185		190		195	

	ggt gct tgg ctt gag ttt gac gtc gat aag cgc gat tcg gtt ggt gtt	1340
	Gly Ala Trp Leu Glu Phe Asp Val Asp Lys Arg Asp Ser Val Gly Val	
	200 205 210	
5	cgt att gac cgc aag cgt cgc cag cca gtc acc gta ctg ctg aag gct	1388
	Arg Ile Asp Arg Lys Arg Arg Gln Pro Val Thr Val Leu Leu Lys Ala	
	215 220 225	
10	ctt ggc tgg acc act gag cag atc acc gag cgt ttc ggt ttc tct gaa	1436
	Leu Gly Trp Thr Thr Glu Gln Ile Thr Glu Arg Phe Gly Phe Ser Glu	
	230 235 240 245	
15	atc atg atg tcc acc ctc gag tcc gat ggt gta gca aac acc gat gag	1484
	Ile Met Met Ser Thr Leu Glu Ser Asp Gly Val Ala Asn Thr Asp Glu	
	250 255 260	
20	gca ttg ctg gag atc tac cgc aag cag cgt cca ggc gag cag cct acc	1532
	Ala Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gln Pro Thr	
	265 270 275	
	cgc gac ctt gcg cag tcc ctc ctg gac aac agc ttc ttc cgt gca aag	1580
	Arg Asp Leu Ala Gln Ser Leu Leu Asp Asn Ser Phe Phe Arg Ala Lys	
	280 285 290	
25	cgc tac gac ctg gct cgc gtt ggt cgt tac aag atc aac cgc aag ctc	1628
	Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Val Gly Arg Tyr Lys Ile Asn Arg Lys Leu	
	295 300 305	
30	ggc ctt ggt ggc gac cac gat ggt ttg atg act ctt act gaa gag gac	1676
	Gly Leu Gly Gly Asp His Asp Gly Leu Met Thr Leu Thr Glu Glu Asp	
	310 315 320 325	
35	atc gca acc acc atc gag tac ctg gtg cgt ctg cac gca ggt gag cgc	1724
	Ile Ala Thr Thr Ile Glu Tyr Leu Val Arg Leu His Ala Gly Glu Arg	
	330 335 340	
40	gtc atg act tct cca aat ggt gaa gag atc cca gtc gag acc gat gac	1772
	Val Met Thr Ser Pro Asn Gly Glu Glu Ile Pro Val Glu Thr Asp Asp	
	345 350 355	
	atc gac cac ttt ggt aac cgt cgt ctg cgt acc gtt ggc gaa ctg atc	1820
	Ile Asp His Phe Gly Asn Arg Arg Leu Arg Thr Val Gly Glu Leu Ile	
	360 365 370	
45	cag aac cag gtc cgt gtc ggc ctg tcc cgc atg gag cgc gtt gtt cgt	1868
	Gln Asn Gln Val Arg Val Gly Leu Ser Arg Met Glu Arg Val Val Arg	
	375 380 385	
50	gag cgt atg acc acc cag gat gcg gag tcc att act cct act tcc ttg	1916
	Glu Arg Met Thr Thr Gln Asp Ala Glu Ser Ile Thr Pro Thr Ser Leu	
	390 395 400 405	
55	atc aac gtt cgt cct gtc tct gca gct atc cgt gag ttc ttc gga act	1964
	Ile Asn Val Arg Pro Val Ser Ala Ala Ile Arg Glu Phe Phe Gly Thr	
	410 415 420	
	tcc cag ctg tct cag ttc atg gtc cag aac aac tcc ctg tct ggt ttg	2012
	Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Val Gln Asn Asn Ser Leu Ser Gly Leu	
	425 430 435	

	act	cac	aag	cgt	cgt	ctg	tcg	gct	ctg	ggc	ccg	ggt	ggt	ctg	tcc	cgt	2060
	Thr	His	Lys	Arg	Arg	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Ser	Arg	
			440					445					450				
5																	
	gag	cgc	gcc	ggc	atc	gag	gtt	cga	gac	gtt	cac	cca	tct	cac	tac	ggc	2108
	Glu	Arg	Ala	Gly	Ile	Glu	Val	Arg	Asp	Val	His	Pro	Ser	His	Tyr	Gly	
		455					460					465					
10																	
	cgt	atg	tgc	cca	att	gag	act	ccg	gaa	ggt	cca	aac	att	ggc	ctg	atc	2156
	Arg	Met	Cys	Pro	Ile	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Pro	Asn	Ile	Gly	Leu	Ile	
	470					475					480					485	
15																	
	ggg	tcc	ttg	gct	tcc	tat	gct	cga	gtg	aac	cca	ttc	ggg	ttc	att	gag	2204
	Gly	Ser	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ala	Arg	Val	Asn	Pro	Phe	Gly	Phe	Ile	Glu	
					490					495					500		
20																	
	acc	cca	tac	cgt	cgc	atc	atc	gac	ggc	aag	ctg	acc	gac	cag	att	gac	2252
	Thr	Pro	Tyr	Arg	Arg	Ile	Ile	Asp	Gly	Lys	Leu	Thr	Asp	Gln	Ile	Asp	
				505				510						515			
25																	
	tac	ctt	acc	gct	gat	gag	gaa	gac	cgc	ttc	gtt	gtt	gcg	cag	gca	aac	2300
	Tyr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Glu	Asp	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Gln	Ala	Asn	
			520					525					530				
30																	
	acg	cac	tac	gac	gaa	gag	ggc	aac	atc	acc	gat	gag	acc	gtc	act	gtt	2348
	Thr	His	Tyr	Asp	Glu	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr	Asp	Glu	Thr	Val	Thr	Val	
		535					540					545					
35																	
	cgt	ctg	aag	gac	ggc	gac	atc	gcc	atg	gtt	ggc	cgc	aac	gcg	gtt	gat	2396
	Arg	Leu	Lys	Asp	Gly	Asp	Ile	Ala	Met	Val	Gly	Arg	Asn	Ala	Val	Asp	
	550					555					560					565	
40																	
	tac	atg	gac	gtt	tcc	cct	cgt	cag	atg	gtt	tct	gtt	ggg	acc	gcg	atg	2444
	Tyr	Met	Asp	Val	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Val	Ser	Val	Gly	Thr	Ala	Met	
					570					575					580		
45																	
	att	cca	ttc	ctg	gag	cac	gac	gat	gct	aac	cgt	gca	ctg	atg	ggc	gcg	2492
	Ile	Pro	Phe	Leu	Glu	His	Asp	Asp	Ala	Asn	Arg	Ala	Leu	Met	Gly	Ala	
				585				590						595			
50																	
	aac	atg	cag	aag	cag	gct	gtg	cca	ctg	att	cgt	gcc	gag	gct	cct	ttc	2540
	Asn	Met	Gln	Lys	Gln	Ala	Val	Pro	Leu	Ile	Arg	Ala	Glu	Ala	Pro	Phe	
			600					605					610				
55																	
	gtg	ggc	acc	ggt	atg	gag	cag	cgc	gca	gca	tac	gac	gcc	ggc	gac	ctg	2588
	Val	Gly	Thr	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Ala	Ala	Tyr	Asp	Ala	Gly	Asp	Leu	
		615					620					625					
60																	
	gtt	att	acc	cca	gtc	gca	ggt	gtg	gtg	gaa	aac	gtt	tca	gct	gac	ttc	2636
	Val	Ile	Thr	Pro	Val	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Phe	
	630					635					640					645	
65																	
	atc	acc	atc	atg	gct	gat	gac	ggc	aag	cgc	gaa	acc	tac	ctg	ctg	cgt	2684
	Ile	Thr	Ile	Met	Ala	Asp	Asp	Gly	Lys	Arg	Glu	Thr	Tyr	Leu	Leu	Arg	
					650					655					660		

	aag ttc cag cgc acc aac cag ggc acc agc tac aac cag aag cct ttg	2732
	Lys Phe Gln Arg Thr Asn Gln Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Pro Leu	
	665 670 675	
5	gtt aac ttg ggc gag cgc gtt gaa gct ggc cag gtt att gct gat ggt	2780
	Val Asn Leu Gly Glu Arg Val Glu Ala Gly Gln Val Ile Ala Asp Gly	
	680 685 690	
10	cca ggt acc ttc aat ggt gaa atg tcc ctt ggc cgt aac ctt ctg gtt	2828
	Pro Gly Thr Phe Asn Gly Glu Met Ser Leu Gly Arg Asn Leu Leu Val	
	695 700 705	
15	gcg ttc atg cct tgg gaa ggc cac aac tac gag gat gcg atc atc ctc	2876
	Ala Phe Met Pro Trp Glu Gly His Asn Tyr Glu Asp Ala Ile Ile Leu	
	710 715 720 725	
20	aac cag aac atc gtt gag cag gac atc ttg acc tcg atc cac atc gag	2924
	Asn Gln Asn Ile Val Glu Gln Asp Ile Leu Thr Ser Ile His Ile Glu	
	730 735 740	
	gag cac gag atc gat gcc cgc gac act aag ctt ggc gcc gaa gaa atc	2972
	Glu His Glu Ile Asp Ala Arg Asp Thr Lys Leu Gly Ala Glu Glu Ile	
	745 750 755	
25	acc cgc gac atc cct aat gtg tct gaa gaa gtc ctc aag gac ctc gac	3020
	Thr Arg Asp Ile Pro Asn Val Ser Glu Glu Val Leu Lys Asp Leu Asp	
	760 765 770	
30	gac cgc ggt att gtc cgc atc ggt gct gat gtt cgt gac ggc gac atc	3068
	Asp Arg Gly Ile Val Arg Ile Gly Ala Asp Val Arg Asp Gly Asp Ile	
	775 780 785	
35	ctg gtc ggt aag gtc acc cct aag ggc gag acc gag ctc acc ccg gaa	3116
	Leu Val Gly Lys Val Thr Pro Lys Gly Glu Thr Glu Leu Thr Pro Glu	
	790 795 800 805	
40	gag cgc ttg ctg cgc gca atc ttc ggt gag aag gcc cgc gaa gtt cgc	3164
	Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ile Phe Gly Glu Lys Ala Arg Glu Val Arg	
	810 815 820	
	gat acc tcc atg aag gtg cct cac ggt gag acc ggc aag gtc atc ggc	3212
	Asp Thr Ser Met Lys Val Pro His Gly Glu Thr Gly Lys Val Ile Gly	
	825 830 835	
45	gtg cgt cac ttc tcc cgc gag gac gac gac gat ctg gct cct ggc gtc	3260
	Val Arg His Phe Ser Arg Glu Asp Asp Asp Asp Leu Ala Pro Gly Val	
	840 845 850	
50	aac gag atg atc cgt atc tac gtt gct cag aag cgt aag atc cag gac	3308
	Asn Glu Met Ile Arg Ile Tyr Val Ala Gln Lys Arg Lys Ile Gln Asp	
	855 860 865	
55	ggc gat aag ctc gct ggc cgc cac ggt aac aag ggt gtt gtc ggt aaa	3356
	Gly Asp Lys Leu Ala Gly Arg His Gly Asn Lys Gly Val Val Gly Lys	
	870 875 880 885	
	att ttg cct cag gaa gat atg cca ttc ctt cca gac ggc act cct gtt	3404
	Ile Leu Pro Gln Glu Asp Met Pro Phe Leu Pro Asp Gly Thr Pro Val	
	890 895 900	

	gac atc atc ttg aac acc cac ggt gtt cca cgt cgt atg aac att ggt	3452
	Asp Ile Ile Leu Asn Thr His Gly Val Pro Arg Arg Met Asn Ile Gly	
	905 910 915	
5	cag gtt ctt gag acc cac ctt ggc tgg ctg gca tct gct ggt tgg tcc	3500
	Gln Val Leu Glu Thr His Leu Gly Trp Leu Ala Ser Ala Gly Trp Ser	
	920 925 930	
10	gtg gat cct gaa gat cct gag aac gct gag ctg gtc aag act ctg cct	3548
	Val Asp Pro Glu Asp Pro Glu Asn Ala Glu Leu Val Lys Thr Leu Pro	
	935 940 945	
15	gca gac ctg ctg gag gtt cct gct ggt tcc ttg act gca act cct gtg	3596
	Ala Asp Leu Leu Glu Val Pro Ala Gly Ser Leu Thr Ala Thr Pro Val	
	950 955 960 965	
20	ttc gac ggt gcg tca aac gaa gag ctg gca ggc ctg ctg gct aat tca	3644
	Phe Asp Gly Ala Ser Asn Glu Glu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Asn Ser	
	970 975 980	
	cgt cca aac cgc gac ggc gac gtc atg gtt aac gcg gat ggt aaa gca	3692
	Arg Pro Asn Arg Asp Gly Asp Val Met Val Asn Ala Asp Gly Lys Ala	
	985 990 995	
25	acg ctt atc gac ggt cgc tcc ggt gag cct tac ccg tac ccg gtt tcc	3740
	Thr Leu Ile Asp Gly Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Pro Tyr Pro Val Ser	
	1000 1005 1010	
30	atc ggc tac atg tac atg ctg aag ctg cac cac ctg gtt gac gag aag	3788
	Ile Gly Tyr Met Tyr Met Leu Lys Leu His His Leu Val Asp Glu Lys	
	1015 1020 1025	
35	atc cac gca cgt tcc act ggt cct tac tcc atg att acc cag cag cca	3836
	Ile His Ala Arg Ser Thr Gly Pro Tyr Ser Met Ile Thr Gln Gln Pro	
	1030 1035 1040 1045	
40	ctg ggt ggt aaa gca cag ttc ggt gga cag cgt ttc ggc gaa atg gag	3884
	Leu Gly Gly Lys Ala Gln Phe Gly Gly Gln Arg Phe Gly Glu Met Glu	
	1050 1055 1060	
45	gtg tgg gca atg cag gca tac ggc gct gcc tac aca ctt cag gag ctg	3932
	Val Trp Ala Met Gln Ala Tyr Gly Ala Ala Tyr Thr Leu Gln Glu Leu	
	1065 1070 1075	
50	ctg acc atc aag tct gat gac gtg gtt ggc cgt gtc aag gtc tac gaa	3980
	Leu Thr Ile Lys Ser Asp Asp Val Val Gly Arg Val Lys Val Tyr Glu	
	1080 1085 1090	
55	gca att gtg aag ggc gag aac atc ccg gat cca ggt att cct gag tcc	4028
	Ala Ile Val Lys Gly Glu Asn Ile Pro Asp Pro Gly Ile Pro Glu Ser	
	1095 1100 1105	
55	ttc aag gtt ctg ctg aag gag ctg cag tcc ttg tgc ctg aac gtg gag	4076
	Phe Lys Val Leu Leu Lys Glu Leu Gln Ser Leu Cys Leu Asn Val Glu	
	1110 1115 1120 1125	

gtt ctc tcc gca gac ggc act cca atg gag ctc gcg ggt gac gac gac 4124
 Val Leu Ser Ala Asp Gly Thr Pro Met Glu Leu Ala Gly Asp Asp Asp
 1130 1135 1140

5 gac ttc gat cag gca ggc gcc tca ctt ggc atc aac ctg tcc cgt gac 4172
 Asp Phe Asp Gln Ala Gly Ala Ser Leu Gly Ile Asn Leu Ser Arg Asp
 1145 1150 1155

10 gag cgt tcc gac gcc gac acc gca tagcagatca gaaaacaacc gctagaaatc 4226
 Glu Arg Ser Asp Ala Asp Thr Ala
 1160 1165

aagccataca tcccccgac attgaagaga tggtctgggg ggaaaggag ttttacgtgc 4286

15 tcgacgtaaa cgtcttcgat gagctccgca tcggcctggc caccgccgac gacatccgcc 4346
 gttggtccaa gggtagggtc aagaagccgg agaccatcaa ctaccgaacc ctcaagcctg 4406
 agaaggacgg tctgttctgc gagcgtatct tcggtccaac tcgcgactgg gagtgcgcct 4466
 20 gcggttaagta caagcgtgtc cgctacaagg gcatcatctg tgaacgctgt ggcgttgagg 4526
 tcaccaagtc caaggtgcgc cgtgagcgca tgggacacat tgagctcgct gcaccagtaa 4586
 25 cccacatttg gtacttcaag ggcgttccat cacgcctcgg ctaccttttg gaccttgctc 4646
 caaaggacct ggacctatc atctacttcg gtgcgaacat catcaccagc gtggacgaag 4706
 aggctcgcca cagcgaccag accactcttg aggcagaaat gcttctggag aagaaggacg 4766
 30 ttgaggcaga cgcagagtct gacattgctg agcgtgctga aaagctcgaa gaggatcttg 4826
 ctgaacttga ggcagctggc gctaaggccg acgctcgccg caaggttcag gctgctgccg 4886
 35 ataaggaaat gcagcacatc cgtgagcgtg cacagcgca aatcgatcgt ctcgatgagg 4946
 tctggcagac cttcatcaag cttgctccaa agcagatgat ccgcatgag aagctctacg 5006
 atgaactgat cgaccgctac gaggattact tcaccggtg tatgggtgca gagtccattg 5066
 40 aggctttgat ccagaacttc gaccttgatg ctg 5099

45 <210> 6
 <211> 1165
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6
 50 Val Leu Glu Gly Pro Ile Leu Ala Val Ser Arg Gln Thr Lys Ser Val
 1 5 10 15
 Val Asp Ile Pro Gly Ala Pro Gln Arg Tyr Ser Phe Ala Lys Val Ser
 20 25 30
 55 Ala Pro Ile Glu Val Pro Gly Leu Leu Asp Leu Gln Leu Asp Ser Tyr
 35 40 45

Ser Trp Leu Ile Gly Thr Pro Glu Trp Arg Ala Arg Gln Lys Glu Glu
 50 55 60
 5 Phe Gly Glu Gly Ala Arg Val Thr Ser Gly Leu Glu Asn Ile Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Pro Ile Gln Asp Tyr Ser Gly Asn Met Ser Leu Ser Leu
 85 90 95
 10 Ser Glu Pro Arg Phe Glu Asp Val Lys Asn Thr Ile Asp Glu Ala Lys
 100 105 110
 Glu Lys Asp Ile Asn Tyr Ala Ala Pro Leu Tyr Val Thr Ala Glu Phe
 115 120 125
 15 Val Asn Asn Thr Thr Gly Glu Ile Lys Ser Gln Thr Val Phe Ile Gly
 130 135 140
 20 Asp Phe Pro Met Met Thr Asp Lys Gly Thr Phe Ile Ile Asn Gly Thr
 145 150 155 160
 Glu Arg Val Val Val Ser Gln Leu Val Arg Ser Pro Gly Val Tyr Phe
 165 170 175
 25 Asp Gln Thr Ile Asp Lys Ser Thr Glu Arg Pro Leu His Ala Val Lys
 180 185 190
 Val Ile Pro Ser Arg Gly Ala Trp Leu Glu Phe Asp Val Asp Lys Arg
 195 200 205
 30 Asp Ser Val Gly Val Arg Ile Asp Arg Lys Arg Arg Gln Pro Val Thr
 210 215 220
 35 Val Leu Leu Lys Ala Leu Gly Trp Thr Thr Glu Gln Ile Thr Glu Arg
 225 230 235 240
 Phe Gly Phe Ser Glu Ile Met Met Ser Thr Leu Glu Ser Asp Gly Val
 245 250 255
 40 Ala Asn Thr Asp Glu Ala Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Lys Gln Arg Pro
 260 265 270
 Gly Glu Gln Pro Thr Arg Asp Leu Ala Gln Ser Leu Leu Asp Asn Ser
 275 280 285
 45 Phe Phe Arg Ala Lys Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Val Gly Arg Tyr Lys
 290 295 300
 50 Ile Asn Arg Lys Leu Gly Leu Gly Gly Asp His Asp Gly Leu Met Thr
 305 310 315 320
 Leu Thr Glu Glu Asp Ile Ala Thr Thr Ile Glu Tyr Leu Val Arg Leu
 325 330 335
 55 His Ala Gly Glu Arg Val Met Thr Ser Pro Asn Gly Glu Glu Ile Pro
 340 345 350
 Val Glu Thr Asp Asp Ile Asp His Phe Gly Asn Arg Arg Leu Arg Thr
 355 360 365

Val Gly Glu Leu Ile Gln Asn Gln Val Arg Val Gly Leu Ser Arg Met
 370 375 380
 5 Glu Arg Val Val Arg Glu Arg Met Thr Thr Gln Asp Ala Glu Ser Ile
 385 390 395 400
 Thr Pro Thr Ser Leu Ile Asn Val Arg Pro Val Ser Ala Ala Ile Arg
 405 410 415
 10 Glu Phe Phe Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Val Gln Asn Asn
 420 425 430
 Ser Leu Ser Gly Leu Thr His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu Gly Pro
 435 440 445
 Gly Gly Leu Ser Arg Glu Arg Ala Gly Ile Glu Val Arg Asp Val His
 450 455 460
 20 Pro Ser His Tyr Gly Arg Met Cys Pro Ile Glu Thr Pro Glu Gly Pro
 465 470 475 480
 Asn Ile Gly Leu Ile Gly Ser Leu Ala Ser Tyr Ala Arg Val Asn Pro
 485 490 495
 25 Phe Gly Phe Ile Glu Thr Pro Tyr Arg Arg Ile Ile Asp Gly Lys Leu
 500 505 510
 Thr Asp Gln Ile Asp Tyr Leu Thr Ala Asp Glu Glu Asp Arg Phe Val
 515 520 525
 30 Val Ala Gln Ala Asn Thr His Tyr Asp Glu Glu Gly Asn Ile Thr Asp
 530 535 540
 35 Glu Thr Val Thr Val Arg Leu Lys Asp Gly Asp Ile Ala Met Val Gly
 545 550 555 560
 Arg Asn Ala Val Asp Tyr Met Asp Val Ser Pro Arg Gln Met Val Ser
 565 570 575
 40 Val Gly Thr Ala Met Ile Pro Phe Leu Glu His Asp Asp Ala Asn Arg
 580 585 590
 Ala Leu Met Gly Ala Asn Met Gln Lys Gln Ala Val Pro Leu Ile Arg
 595 600 605
 45 Ala Glu Ala Pro Phe Val Gly Thr Gly Met Glu Gln Arg Ala Ala Tyr
 610 615 620
 50 Asp Ala Gly Asp Leu Val Ile Thr Pro Val Ala Gly Val Val Glu Asn
 625 630 635 640
 Val Ser Ala Asp Phe Ile Thr Ile Met Ala Asp Asp Gly Lys Arg Glu
 645 650 655
 55 Thr Tyr Leu Leu Arg Lys Phe Gln Arg Thr Asn Gln Gly Thr Ser Tyr
 660 665 670

Asn Gln Lys Pro Leu Val Asn Leu Gly Glu Arg Val Glu Ala Gly Gln
 675 680 685
 5 Val Ile Ala Asp Gly Pro Gly Thr Phe Asn Gly Glu Met Ser Leu Gly
 690 695 700
 Arg Asn Leu Leu Val Ala Phe Met Pro Trp Glu Gly His Asn Tyr Glu
 705 710 715 720
 10 Asp Ala Ile Ile Leu Asn Gln Asn Ile Val Glu Gln Asp Ile Leu Thr
 725 730 735
 Ser Ile His Ile Glu Glu His Glu Ile Asp Ala Arg Asp Thr Lys Leu
 740 745 750
 15 Gly Ala Glu Glu Ile Thr Arg Asp Ile Pro Asn Val Ser Glu Glu Val
 755 760 765
 Leu Lys Asp Leu Asp Asp Arg Gly Ile Val Arg Ile Gly Ala Asp Val
 770 775 780
 Arg Asp Gly Asp Ile Leu Val Gly Lys Val Thr Pro Lys Gly Glu Thr
 785 790 795 800
 25 Glu Leu Thr Pro Glu Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ile Phe Gly Glu Lys
 805 810 815
 Ala Arg Glu Val Arg Asp Thr Ser Met Lys Val Pro His Gly Glu Thr
 820 825 830
 30 Gly Lys Val Ile Gly Val Arg His Phe Ser Arg Glu Asp Asp Asp Asp
 835 840 845
 Leu Ala Pro Gly Val Asn Glu Met Ile Arg Ile Tyr Val Ala Gln Lys
 850 855 860
 Arg Lys Ile Gln Asp Gly Asp Lys Leu Ala Gly Arg His Gly Asn Lys
 865 870 875 880
 40 Gly Val Val Gly Lys Ile Leu Pro Gln Glu Asp Met Pro Phe Leu Pro
 885 890 895
 Asp Gly Thr Pro Val Asp Ile Ile Leu Asn Thr His Gly Val Pro Arg
 900 905 910
 45 Arg Met Asn Ile Gly Gln Val Leu Glu Thr His Leu Gly Trp Leu Ala
 915 920 925
 Ser Ala Gly Trp Ser Val Asp Pro Glu Asp Pro Glu Asn Ala Glu Leu
 930 935 940
 Val Lys Thr Leu Pro Ala Asp Leu Leu Glu Val Pro Ala Gly Ser Leu
 945 950 955 960
 55 Thr Ala Thr Pro Val Phe Asp Gly Ala Ser Asn Glu Glu Leu Ala Gly
 965 970 975
 Leu Leu Ala Asn Ser Arg Pro Asn Arg Asp Gly Asp Val Met Val Asn
 980 985 990

Ala Asp Gly Lys Ala Thr Leu Ile Asp Gly Arg Ser Gly Glu Pro Tyr
995 1000 1005

5 Pro Tyr Pro Val Ser Ile Gly Tyr Met Tyr Met Leu Lys Leu His His
1010 1015 1020

Leu Val Asp Glu Lys Ile His Ala Arg Ser Thr Gly Pro Tyr Ser Met
025 1030 1035 1040

10 Ile Thr Gln Gln Pro Leu Gly Gly Lys Ala Gln Phe Gly Gly Gln Arg
1045 1050 1055

Phe Gly Glu Met Glu Val Trp Ala Met Gln Ala Tyr Gly Ala Ala Tyr
15 1060 1065 1070

Thr Leu Gln Glu Leu Leu Thr Ile Lys Ser Asp Asp Val Val Gly Arg
1075 1080 1085

20 Val Lys Val Tyr Glu Ala Ile Val Lys Gly Glu Asn Ile Pro Asp Pro
1090 1095 1100

Gly Ile Pro Glu Ser Phe Lys Val Leu Leu Lys Glu Leu Gln Ser Leu
105 1110 1115 1120

25 Cys Leu Asn Val Glu Val Leu Ser Ala Asp Gly Thr Pro Met Glu Leu
1125 1130 1135

Ala Gly Asp Asp Asp Asp Phe Asp Gln Ala Gly Ala Ser Leu Gly Ile
30 1140 1145 1150

Asn Leu Ser Arg Asp Glu Arg Ser Asp Ala Asp Thr Ala
1155 1160 1165

35

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rpsL-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c)wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des ribosomalen Proteins S12 aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
5 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,
und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung
10 unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC
durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das rpsL-Gen verstärkt,
insbesondere überexprimiert wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte
20 durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das rpsL-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere
25 überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den
Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
30 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien

einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das rpsL-Gen kodierende
Nukleotidsequenz trägt.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das rpsL-Gen
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
überexprimiert.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die
regulatorischen/katalytischen Eigenschaften des
Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das
Polynukleotid rpsL kodiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
 - 30 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
 - 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-
Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,
- 5 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyC,
- 10 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15.10 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1,
- 15 15.11 das für die RNA-Polymerase B kodierende rpoB-Gen

verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
20 von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,
- 25 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB

16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.

17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 5 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 10 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für das ribosomale Protein S12 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des rpsL-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid, 15 enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.
- 20 20. Verfahren gemäß Anspruch 18, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro arrays oder DNA-chips einsetzt.
- 25 21. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen Aminosäuresequenzen zwischen den Positionen 38 bis 48 in der SEQ ID No. 2 durch Aminosäureaustausch verändert sind.
- 30 22. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen Aminosäuresequenzen an Position 43 in der SEQ ID No. 2 jede andere proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Lysin enthalten.

23. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen Aminosäuresequenzen an Position 43 in der SEQ ID No. 2 L-Histidin oder L-Arginin enthalten.
- 5 24. DNA gemäß Anspruch 23 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß diese für das ribosomale Protein S12 kodiert, dessen Aminosäuresequenz an Position 43 L-Arginin enthält, dargestellt in SEQ ID No. 4.
- 10 25. DNA gemäß Anspruch 24 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß diese an Position 627 die Nukleobase Guanin enthält, dargestellt in SEQ ID No 3.
- 15 26. Coryneforme Bakterien die eine DNA gemäß Anspruch 21, 22, 23, 24 oder 25 enthalten.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das rpsL-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.